

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年11月27日 (27.11.2003)

PCT

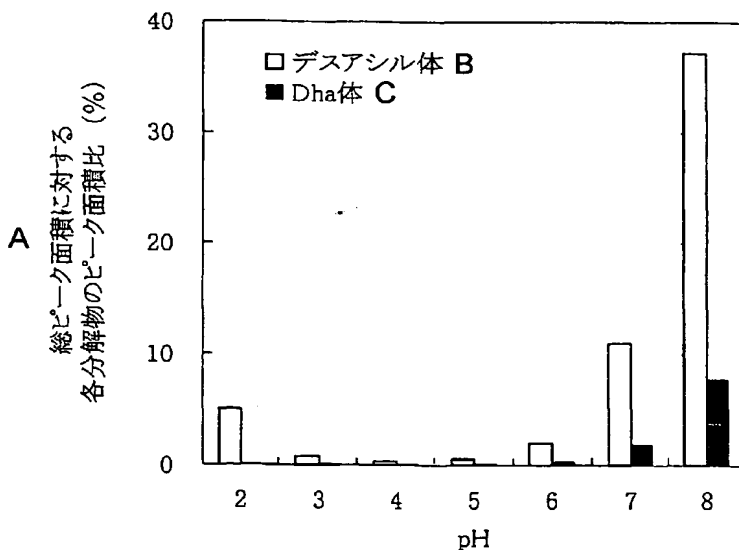
(10) 国際公開番号  
WO 03/097083 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/25, 9/08, 47/02, 47/04, 47/12, 47/18, A61P 5/10, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/06349
- (22) 国際出願日: 2003年5月21日 (21.05.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-146155 2002年5月21日 (21.05.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一サントリーファーマ株式会社 (DAIICHI SUNTORY PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒102-8530 東京都千代田区麹町五丁目7番地2 Tokyo (JP). 寒川 賢治 (KANGAWA, Kenji) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東6丁目28 4-201号 (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 南竹 義春 (MINAMITAKE, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒370-0311 群馬県新田郡新田町瑞木3 4-3 Gunma (JP). 松本 大 (MATSUMOTO, Masaru) [JP/JP]; 〒374-0076 群馬県館林市日向町1 0 0 0-5-A 2 0 3 Gunma (JP).

[続葉有]

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING GHRELIN

(54) 発明の名称: グレリン含有医薬組成物



A...RATIO (%) OF PEAK AREA OF EACH  
DECOMPOSITION PRODUCT TO TOTAL PEAK  
AREA  
B...DESACYL COMPOUND  
C...Dha COMPOUND

(57) Abstract: It is intended to provide a medicinal composition containing a ghrelin, which is an endogenous growth hormone secretion promoter (GHS) to a growth hormone secretion promoter receptor (GHS-R), or a ghrelin derivative in a stable state. A medicinal composition containing ghrelin(s) which comprises an aqueous solution characterized in that the aqueous solution having ghrelin(s) dissolved therein has a pH value of from 2 to 7, wherein the aqueous solution having a pH value of from 2 to 7 is a buffer solution, in particular, a glycine hydrochloride buffer solution, acetate buffer solution, citrate buffer solution, lactate buffer solution, phosphate buffer solution, citrate-phosphate buffer solution, phosphate-acetate-borate buffer solution or phthalate buffer solution, and the concentration of ghrelin or its derivative in the aqueous solution is from 0.03 nmol/mL to 6  $\mu$  mol/mL.

(57) 要約: 成長ホルモン分泌促進因子レセプター (GHS-R) に対する内因性成長ホルモン分泌促進因子 (GHS) であるグレリンまたはグレリン誘導体を安定に含有する医薬組成物を提供するものであり、グレリン類を溶解した水溶液

のpHが2~7の範囲にあることを特徴とする水溶液からなる、グレリン類を含有する医薬組成物であり、pHが2~7の範囲内にある水溶液

[続葉有]



(74) 代理人: 草間 攻 (KUSAMA, Osamu); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋 4 丁目 5 番 1 2 号 岩田ビル 7 階  
草間特許事務所 Tokyo (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, IL, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

が、緩衝液、特にグリシン塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸-リン酸緩衝液、リン酸-酢酸-ホウ酸緩衝液またはフタル酸緩衝液であり、水溶液中のグレリンまたはグレリン誘導体の濃度が、 $0.03 \text{ nmol/mL} \sim 6 \mu\text{mol/mL}$ である医薬組成物である。

## 明細書

## グレリン含有医薬組成物

## 5 技術分野

本発明は、成長ホルモン分泌促進因子レセプター（GHS-R）に対する内因性成長ホルモン分泌促進因子（GHS）であるグレリンまたはグレリン誘導体を安定に含有する医薬組成物、及びグレリンまたはグレリン誘導体を溶解した水溶液中においてグレリンまたはグレリン誘導体の疎水性修飾構造の分解を抑制する

## 10 方法に関する。

## 背景技術

グレリンは、オーファンレセプターの一つである成長ホルモン分泌促進因子レセプター（GHS-R）に対する内因性成長ホルモン分泌促進因子（GHS）であり、1999年にラットから最初に単離精製された生理活性ペプチドである（Kojimaら：Nature, 402巻、656-660頁、1999年）。その後、ラット以外の脊椎動物、例えばヒト、マウス、ブタ、ニワトリ、ウナギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、カエル、ニジマス、イヌからも、類似した構造を有するグレリンが知られており、その構造式を第1表に示す。

第1表

ヒト (Human)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
ラット (Rat)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
マウス (Mouse)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
ブタ (Porcine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKVQQRKESKKPAKLKPR
ウシ (Bovine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEAKKPSGRLKPR
ヒツジ (Ovine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
イヌ (Canine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR
ウナギ (Eel)	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQRPQGKDKKPPRV-NH <sub>2</sub>
ニジマス (Trout)	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQVRQGKGKPPRV-NH <sub>2</sub>
	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQKGKPPRV-NH <sub>2</sub>
ニワトリ (Chicken)	: GSS (n-octanoyl) FLSPTYKNIQQQKTRKPTAR
	: GSS (n-octanoyl) FLSPTYKNIQQQKTRKPTAR
	: GSS (n-octanoyl) FLSPTYKNIQQQKTRKPTARLH
ウシガエル (Bullfrog)	: GLT (n-octanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNM
	: GLT (n-decanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNM
	: GLT (n-octanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNN
テラピア (Tilapia)	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH <sub>2</sub>
ナマズ (Catfish)	: GSS (n-octanoyl) FLSPTQKPQNRGDRKPPRV-NH <sub>2</sub>
	: GSS (n-octanoyl) FLSPTQKPQNRGDRKPPRVG
ウマ (Equine)	: GSS (n-butanoyl) FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR

(上記表中、アミノ酸残基は、IUPACまたはIUCの一文字標記により表している。)

- 5      本ペプチドは、3位のセリン残基(S)あるいはスレオニン残基(T)の側鎖水酸基がオクタン酸、デカン酸などの脂肪酸によりアシル化された特異的な構造を有するペプチドであり、このような疎水性修飾構造を有する生理活性ペプチドは、グレリン以外に生体から単離された例はない。この新規ペプチドは、強力な成長ホルモン分泌促進活性を有し、成長ホルモン分泌の調節に機能することが解
- 10    明されており、グレリンの生理活性的役割と、医薬品への適用に関して興味がある。

たれている（国際公開WO 01/07475号公報）。

- グレリンは、分子中の疎水性修飾構造がその生理活性発現に必須であることが判明している（Kojima ら：Nature, 402 巻、656-660 頁、1999 年）が、特定の水酸基含有アミノ酸側鎖に脂肪酸修飾基が置換したペプチドがこれまで発見されて
- 5 いなかったことより、このペプチドを医薬品として開発する場合の安定性等に関しては、これまで一切検討がなされていない。

- ところで、医薬品として開発される化合物は様々な化学構造を有しているものであり、その化学構造によっては製剤化工程中、あるいは製剤化後の保存中に、
- 10 種々の分解反応を受けることがある。この分解反応としては、化合物自体の加水分解、脱水、異性化、脱離、酸化、還元、光分解反応などに加え、化合物と共に配合される添加剤等との化学反応が挙げられる。したがって、それらの化学構造から分解反応の種類、その程度を検討、把握することは、医薬品の製剤開発過程、さらにはその後の品質確保において、極めて重要なものである。

- 15 また一般に、医薬品の安定性は、その医薬品である薬物を含有する環境の pH に大きく支配されることが知られている。特に溶液状態においては、医薬品の分解速度に及ぼす pH の影響が古くから研究されており、既に、多くの薬物について、その分解速度の pH プロファイルが報告されている（吉岡澄江：「医薬品の安定性」、南光堂、1995 年など）。

- 20 医薬品のなかでも、生理活性ペプチドあるいは生理活性タンパク質は、消化管内のプロテアーゼによる分解で不活性化されることから、経口投与製剤としての開発は困難なものであり、そのほとんどが注射剤としての製剤形態で臨床的に供されている。そのため、生理活性ペプチドあるいは生理活性タンパク質の製剤化にあたっては、溶液型製剤あるいは用時溶解型製剤等の剤型の種類に関係なく、
- 25 溶液中での安定性が、特に重要な要素となっている。

現在、インスリン、成長ホルモン、カルシトニン、心房性ナトリウム利尿ペプチド、LH-RH 誘導体、副腎皮質刺激ホルモン誘導体などの種々のペプチドあ

るいはタンパク質製剤が、医薬品として販売されている。これらのペプチドあるいはタンパク質においてみられる化学的変化としては、脱アミド化、イソAsp化、断片化等の加水分解、ラセミ化、ジスルフィド生成・交換反応、 $\beta$ 脱離、酸化反応などが報告されている。

- 5      ペプチドあるいはタンパク質製剤の安定性に影響を与える上記化学的変化は、種々の要因に基づくものであるが、なかでも水溶液のpHにより分解反応が大きく左右される。例えば、LH-RH誘導体 (Strickley ら: Pharm. Res., 7 巻, 530-536 頁, 1990 年)、ヒト副甲状腺ホルモン (Nobuchi ら: Pharm. Res., 14 巻, 1685-1690 頁, 1997 年)、ヒルジン (トロンピン阻害剤) (Gietz ら: Pharm. Res., 15 巻, 1456-1462 頁, 1998 年)、ヒトアミリン誘導体 (Hekmann ら: Pharm. Res., 15 巻, 650-659 頁, 1998 年) は、水溶液のpHに依存して、分解物の構造や生成量が異なることが報告されている。

- 15      本発明が目的とするグレリンまたはグレリン誘導体も、生理活性ペプチドであるため、このものを医薬品として製剤化するにあたっては水溶液製剤とするのが一般的である。したがって、溶液状態での安定性に関する知見は、これら化合物の製剤化において重要な情報であるが、グレリンまたはグレリン誘導体については、その安定性についての検討は何らなされていない。特に、グレリンまたはグレリン誘導体は、特定の水酸基含有アミノ酸側鎖が脂肪酸により修飾された構造を有し、このような特異的な疎水性修飾構造を有するペプチドがこれまで発見されていなかったため、安定性に関しての一般的な知見もない。

- 20      すなわち、グレリンの安定性に関する各種の情報、分解物の構造や、その生成機構については未知である。さらに、特異的な疎水性修飾構造の分解機構、また疎水性修飾構造の分解物からの二次的なグレリンの分解についても、全く知られていないのが現状である。

25      したがって本発明は、特異的な疎水性修飾構造を有するグレリンまたはグレリン誘導体について、その化学的安定性の検討を行い、その結果得られる知見をも

とに、グレリンまたはグレリン誘導体を含有する安定性に優れた医薬組成物を提供すること、およびグレリンまたはグレリン誘導体を溶解した水溶液中においてグレリンまたはグレリン誘導体の疎水性修飾構造の分解を抑制する方法を提供することを課題とする。

5

かかる課題を解決するために、本発明者らはグレリンまたはグレリン誘導体の水溶液の安定性に及ぼすpHの影響、その分解物の構造について詳細に検討を行った。その結果、グレリンは、その特異的な疎水性修飾基が加水分解により脱離してデスアシル体が生成すること、またその一方で、疎水性修飾基が $\beta$ 脱離して  
10 デヒドロアラニン体が生成すること、さらに、このデヒドロアラニン体は不安定であり、更なる二次分解物等が生成すること、また、これらの分解は、その水溶液のpHに大きく影響されることを見出した。

さらに、これらグレリンの分解機構の解析結果を基にして、グレリンを含有する水溶液のpHを、pH調節剤または緩衝剤を添加して制御することによりグレ  
15 リンを安定に含有する医薬品組成物が得られることを見出した。また、pHを調節する緩衝成分の種類や濃度、さらにはグレリンの濃度等について種々の検討を行い、緩衝剤添加による水溶液の安定化効果は、その緩衝成分の種類や、濃度、さらにはグレリンの濃度等に大きく依存せず、種々の緩衝剤に適用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

20

#### 発明の開示

したがって本発明の基本的態様は、グレリンまたはグレリン誘導体およびこれらの塩（以下、「グレリン類」と記す）を溶解した水溶液のpHが2～7の範囲にあることを特徴とする水溶液からなるグレリン類を安定に含有する医薬組成物で  
25 ある。

本発明の具体的態様を以下に示す。

(1) グレリン類を溶解した水溶液のpHが2～7の範囲にあることを特徴とす

る水溶液からなるグレリン類を含有する医薬組成物。

(2) pHが3～6である上記(1)に記載の医薬組成物。

(3) pH調節剤または緩衝剤を添加した上記(1)または(2)に記載の医薬組成物。

5 (4) 塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、炭酸、重炭酸、グルコン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クエン酸、モノエタノールアミン、乳酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、メタンスルホン酸、リンゴ酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、またはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上をpH調節剤として含む上記(3)に記載の医薬組成物。

10 (5) グリシン、酢酸、クエン酸、ホウ酸、フタル酸、リン酸、コハク酸、乳酸、酒石酸、炭酸、塩酸、水酸化ナトリウムまたはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上を緩衝剤として含む上記(3)に記載の医薬組成物。

(6) 水溶液中のpH調節剤または緩衝剤の濃度が0.01～1000mMである上記(3)ないし(5)の何れか一項に記載の医薬組成物。

15 (7) 水溶液が緩衝液である上記(1)ないし(6)の何れか一項に記載の医薬組成物。

(8) 緩衝液が、グリシン塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸－リン酸緩衝液、リン酸－酢酸－ホウ酸緩衝液またはフタル酸緩衝液である上記(7)に記載の医薬組成物。

20 (9) 水溶液中のグレリン類の濃度が、0.03nmol/mL～6μmol/mLである上記(1)ないし(8)の何れか一項に記載の医薬組成物。

(10) グレリン類が酢酸塩である上記(1)ないし(9)の何れか一項に記載の医薬組成物。

(11) グレリン類がヒトグレリンである上記(1)ないし(11)の何れか一項に記載の医薬組成物。

25

(12) 吸着抑制剤を含有する上記(1)ないし(12)の何れか一項に記載の医薬組成物。



(13) 吸着抑制剤の濃度が0.001～5%である上記(12)に記載の医薬組成物。

(14) 吸着抑制剤が界面活性剤である上記(12)または(13)に記載の医薬組成物。

5 (15) 上記(1)ないし(14)に記載の水溶液を乾燥して得られる粉末を含有することを特徴とするグレリン類を含有する医薬組成物。

(16) 乾燥して得られる粉末が、凍結乾燥して得られる粉末である上記(15)に記載の医薬組成物。

10 (17) グレリン類を溶解した水溶液において、水溶液のpHを2～7の範囲にすることを特徴とする、グレリン類の疎水性修飾構造の分解を抑制する方法。

(18) pHが3～6である上記(17)に記載の方法。

(19) pH調節剤または緩衝剤を添加した上記(17)または(18)に記載の方法。

15 (20) 塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、炭酸、重炭酸、グルコン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クエン酸、モノエタノールアミン、乳酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、メタンスルホン酸、リンゴ酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、またはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上をpH調節剤として添加することからなる上記(19)に記載の方法。

20 (21) グリシン、酢酸、クエン酸、ホウ酸、フタル酸、リン酸、コハク酸、乳酸、酒石酸、炭酸、塩酸、水酸化ナトリウムまたはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上を緩衝剤として添加することからなる上記(19)に記載の方法。

25 (22) 水溶液中のpH調節剤または緩衝剤の濃度が0.01～1000mMである上記(19)ないし(21)の何れか一項に記載の方法。

(23) 水溶液が緩衝液である上記(17)ないし(22)の何れか一項に記載の方法。

(24) 緩衝液が、グリシン塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸－リン酸緩衝液、リン酸－酢酸－ホウ酸緩衝液またはフタル酸緩衝液である上記(23)に記載の方法。

5 (25) 水溶液中のグレリン類の濃度が、 $0.03 \text{ nmol/mL} \sim 6 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ である上記(17)ないし(24)の何れか一項に記載の医薬組成物。

(26) グレリン類が酢酸塩である上記(17)ないし(25)の何れか一項に記載の方法。

(27) グレリン類がヒトグレリンである上記(1)ないし(11)の何れか一項に記載の方法。

10

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1で検討したグレリン含有水溶液中でのグレリンおよびデスアシル体およびDha体の分解パターンを示すHPLCチャート図である。

第2図は、グレリンのpH－分解速度定数プロファイルを示すグラフである

15 第3図は、各pHの水溶液中におけるグレリンの分解物の生成量を示すグラフである。

第4図は、各緩衝液中におけるグレリンのpH安定性を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

20 以下に、本発明が提供する医薬組成物について、その詳細を説明する。

本発明で提供する医薬組成物に係るグレリン類は、内因性の成長ホルモン分泌促進因子(GHS)であり、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性、および成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドである。なかでも、グレリンとして第1表に記載された構造式を有するヒト、ラット、ブタ、ニワトリ、ウナギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、カエル、ニジマス、またはイヌ由来のグレリンが好ましいが、更に好ましいのはヒト由来のグレリンであり、特に好ましいのは28個のアミノ酸を有するヒト由来のグレリンである。

25

さらに、グレリン類の構造上の特徴である疎水性修飾構造については、オクタノイル基 ( $C_8$ ) に限定されるものではなく、ヘキサノイル基 ( $C_6$ )、デカノイル基 ( $C_{10}$ )、ドデカノイル基 ( $C_{12}$ ) 等の炭素原子数 2 ~ 20、好ましくは炭素原子数 4 ~ 12 程度の脂肪酸による修飾構造であってもよく、さらに分枝構造を有する脂肪酸や不飽和脂肪酸による修飾構造、また、フェニルプロピオニル基などの芳香環を含む修飾構造や、アダマンタン骨格を持つ修飾構造等に置き換わ

5 っているもよい。

したがって、本発明においてグレリン誘導体とは、第 1 表に記載された構造式を有するグレリンのペプチド主鎖におけるアミノ酸配列において、その一部の

10 アミノ酸が挿入、除去、置換及び／又は付加等しており、更に必要に応じて化学的に修飾されていてもよく、且つペプチド主鎖と疎水性修飾基がエステル結合で結合しているグレリンと同様の生理活性を示すペプチドをいう。

本発明が提供する医薬組成物に係るグレリン類は、遊離のペプチドのほか、塩の形態のものを含むことができる。遊離のペプチドとその塩は、慣用の方法により相互に変換可能である。遊離のペプチドを、薬理的に許容できる塩とする場合には、例えば、遊離ペプチドを無機酸あるいは有機酸と反応させることにより行うことができる。このような塩としては、例えば、炭酸塩、重炭酸塩、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、ホウ酸塩等の無機酸との塩；例えば、コハク酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、トリフルオロ酢酸塩等の有機酸との塩が挙げられる。

15

20

さらに、無機塩基、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、または有機塩基、例えば、トリエチルアミン等の有機アミン類、アルギニン等の塩基性アミノ酸類等などとの塩を挙げることができる。また、該ペプチドは、金属錯体化合物（例えば、銅錯体、亜鉛錯体等）を形成してもよい。

25

本発明が提供する医薬組成物においては、上記の塩の形態はグレリン類の安定化のためには重要な意味を有する。すなわち、塩の形態によりグレリン類を水溶

液とした際のpHは異なるため、グレリン類に用いた上記の塩類も、pH調節剤としての役割を有する。

また、本発明に係るグレリン類について、その起源は特に限定されるものではなく、その製法についても化学合成法、半化学合成法、遺伝子組換え法若しくはそれらを適宜組合せた製造法、または生体から抽出などにより得られたもののいずれであってもよい。

医薬品の原薬として使用されるグレリン類は、通常、逆相液体クロマトグラフィー等によって精製され、凍結乾燥品として供給される。

10 本発明において水溶液または溶液とは、溶媒として水を用いたものをいうが、医薬品として許容される範囲であれば、水以外の溶媒を含んでもよい。例えば、エタノール、2-プロパノール等を用いることができる。

本発明が提供する医薬組成物に含有されるグレリン類の濃度は、医薬品として提供できる範囲であれば特に限定されない。すなわち、下限としては、医薬品として薬効を示す濃度であればよく、上限としては、水溶液中で溶解できる濃度であればよい。好ましくは、一般的に利用されている製剤含有量である $0.03 \text{ nmol/mL} \sim 6 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ 程度、より好ましくは $0.03 \text{ nmol/mL} \sim 3 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ 程度の範囲とすればよい。

本発明が提供するグレリン類を安定に含有する医薬組成物において、水溶液としてはそのpHが好ましくは2～7であり、より好ましくは3～6である。すなわち、グレリン類を含有する水溶液として安定なpHは、2～7の範囲であることが判明した。このpHの調節には、例えばpH調節剤や、緩衝剤を用いて行うことができる。

pH調節剤としては、塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、炭酸、重炭酸、グルコン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クエン酸、モノエタノールアミン、乳酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、メタンスルホン酸、リンゴ酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、またはこれらの塩などを挙

げることができる。

また、緩衝剤としては、グリシン、酢酸、クエン酸、ホウ酸、フタル酸、リン酸、コハク酸、乳酸、酒石酸、炭酸、塩酸、水酸化ナトリウムまたはこれらの塩などを挙げることができ、特にグリシン、酢酸、クエン酸が好ましい。

- 5 水溶液中でのグレリン類の安定性を考慮した場合、保存中における水溶液のpHの変動が小さいほうが好ましい。したがって、本発明の医薬組成物は、緩衝能を有する水溶液、すなわち緩衝液であることが好ましい。

- 緩衝液としては、グレリン類の分解が抑制される範囲、すなわち、好ましくはpH 2～7、より好ましくはpH 3～6の範囲に緩衝作用を有する緩衝液が有利  
10 に使用される。好ましい緩衝液としては、グリシン塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸－リン酸緩衝液（マクイルバイン（McIlvaine）緩衝液を含む）、リン酸－酢酸－ホウ酸緩衝液（ブリットン－ロビンソン（Britton-Robinson）緩衝液を含む）、フタル酸緩衝液が挙げられる。緩衝液に用いられる成分の例としては、上述の緩衝剤を用いることができる。

- 15 pH調節剤を添加する場合の濃度は特に限定されず、通常用いられる程度の濃度であり、かつ目的とするpHに調節することができる濃度範囲であればよく、通常は、0.01～1000mMの範囲である。

- 緩衝剤の濃度も特に限定されず、緩衝能を維持できる濃度であればよく、通常は、0.01～1000mMであり、より好ましくは0.1～100mMであり、  
20 さらに好ましくは1～100mMである。

また、本発明によれば、安定性が確保されたグレリン類を含有する水溶液の形態の医薬組成物が提供されるが、さらに、例えば注射剤一般に必要な要件である浸透圧、溶解性、低刺激性、防腐効果および吸着抑制効果などを考慮して各種添加剤を選択して使用することができる。

25

ところで、一般にペプチドまたはタンパクを含有する水溶液製剤は、製造時や投与時において、使用する器具類に対してペプチドまたはタンパク質が吸着して、

含量低下をきたすことが懸念される。本発明の医薬組成物においても、医薬品として提供することを想定したグレリン類の濃度の範囲内で、当該グレリン類がガラス製容器やポリプロピレン製容器へ吸着する事実が認められた。したがって、本発明が提供する医薬組成物においては、グレリン類の容器等への吸着を軽減するために、吸着抑制剤を添加するのがよい。

そのような吸着抑制剤としては、例えば界面活性剤、糖類、アミノ酸またはタンパク質類を挙げることができる。

本発明でいう界面活性剤とは、医薬品添加物事典などに記載されている界面活性剤のほか、界面活性作用を有する化合物全般を含み、これらの中から適宜選択して用いることができる。具体的には例えば、四級アンモニウム塩類、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ソルビタン脂肪酸エステル類、パラベン類、ポリエチレングリコール類、リン脂質類、胆汁酸類、ポリオキシエチレンヒマシ油類、ポリオキシエチレン類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン類、多価アルコール類、陰イオン界面活性剤、合成または半合成高分子類などを挙げることができ、特にポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ソルビタン脂肪酸エステル類が好ましい。

四級アンモニウム塩類としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウムなどが挙げられる。ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート 20、Tween 20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（ポリソルベート 40、Tween 40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（ポリソルベート 60、Tween 60）、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート（ポリソルベート 65、Tween 65）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ポリソルベート 80、Tween 80）、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート（ポリソルベート 85、Tween 85）などが挙げられる。ソルビタン脂肪酸エステル類としては、ソルビタンモノラウレート（Span 20）、ソルビタンモノパルミテート（Span 40）、ソルビタンモノステアレート（Span 60）、ソルビタンモ

ノオレート (Span 80)、ソルビタントリオレート (Span 85)、ソルビタンセスキオレエートなどが挙げられる。

5      パラベン類としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、  
パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸  
イソブチルなどが挙げられる。ポリエチレングリコール類としては、グリコフロ  
ール (Glycofurol 75)、マクロゴール 400 (ポリエチレングリコール 400)、マク  
ロゴール 600 (ポリエチレングリコール 600)、マクロゴール 4000 (ポリエチレン  
グリコール 4000) などが挙げられる。リン脂質類としては、精製大豆レシチン、  
精製卵黄レシチンなどが挙げられる。胆汁酸類としては、デスオキシコール酸ナ  
トリウムなどが挙げられる。

10      ポリオキシエチレンヒマシ油類としては、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリ  
オキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 50、ポリオキシ  
エチレン硬化ヒマシ油 60 などが挙げられる。また、他のポリオキシエチレン類と  
しては、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンステアシル  
15      エーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンラウリル硫  
酸塩などが挙げられる。ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン類としては、  
ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール (プルロニック)、ポリオキ  
シエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテルなどが挙げられる。

20      多価アルコール類としては、グリセリン (グリセロール)、プロピレングリコー  
ル、モノステアリン酸グリセリンなどが挙げられる。陰イオン界面活性剤として  
は、セチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム  
等のアルキル硫酸塩、ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等のアルキル  
スルホコハク酸エステル塩などが挙げられる。合成または半合成高分子類として  
は、ポリビニルアルコール、カルボキシビニルポリマー、ポリビニルピロリドン、  
25      ポリアクリル酸ナトリウムなどが挙げられる。

糖類としては、例えば、単糖類として、マンニトール、ブドウ糖、果糖、イノ  
シトール、ソルビトール、キシリトールなどが挙げられ、二糖類として、乳糖、

白糖（スクロース）、マルトース、トレハロースなどが挙げられ、多糖類として、デンプン、デキストラン、プルラン、アルギン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、フィチン酸、フィチン、キチン、キトサンなどが挙げられ、デキストリン類として、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ、ヒドロキシエチルスターチなどが挙げられ、セルロース類として、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどが挙げられる。

アミノ酸またはタンパク質類としては、例えば、アミノ酸類として、グリシン、タウリンなどが挙げられ、ポリアミノ酸類として、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリグリシン、ポリロイシンなどが挙げられ、タンパク質類として、アルブミン、ゼラチンなどが挙げられる。

なお、本発明が提供する医薬組成物が、動物実験用を含め試験試薬用組成物あるいは獣医用医薬品である場合には、非ヒト血清アルブミンを用いることができるが、ヒトの治療を目的とする医薬組成物である場合には、ヒト血清アルブミンを用いるのが好ましい。

これらの吸着抑制剤は、複数種を組合せて使用することもできる。本発明の医薬組成物において、含有される吸着抑制剤の量は、グレリン類の容器への吸着の抑制に効果のある濃度であって、かつ、本発明の医薬組成物の製造時や長期保存時に微粒子の生じない範囲で適宜設定できるが、医薬品として添加可能な範囲であることが望ましい。例えば、0.001～5%、好ましくは、0.01～1%が望ましい。

その他、本発明の医薬組成物においては、目的に応じて各種の添加剤を添加することができる。そのような添加剤としては、例えば、塩化ナトリウム、マンニトールなどの等張化剤；安息香酸ナトリウムなどの防腐剤；亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸などの抗酸化剤；塩酸リドカイン、塩酸メプリルカインなどの無痛化剤などを、「医薬品添加物事典2000（薬事日



報社、日本医薬品添加剤協会編集)」に掲載されているもの等から、適宜選択し使用することができる。

本発明により提供される医薬組成物の製造は、製剤学上慣用される製造法によって行うことができる。例えば、凍結乾燥品として提供される原薬としてのグレリン類を精製水により溶解し、一方で、緩衝剤や吸着抑制剤およびその他の添加剤を精製水で溶解する。その後、これらの原薬溶解液および添加剤溶解液を混合し、適宜、滅菌濾過などの工程を施した後、アンプルやバイアル等に分注してグレリン類を含有する製剤を得ることができる。

- 10      また、注射剤のとり得る形態に用時溶解型の製剤がある。これは溶液中で長期間にわたる安定性の確保が困難な場合に適した剤型である。したがって、本発明にあっては、水などの溶媒に溶解した場合に、上述した水溶液の形態をとる組成物、すなわち、グレリン類を含有する水溶液の医薬組成物となるような、用時溶解型の医薬組成物も本発明の1つの形態である。用時溶解型の医薬組成物は、例えば、粉末品等の固体組成物として供給される原薬に、目的に応じて前述の各種添加剤を適宜選択し、必要量添加して得ることができる。あるいは、グレリン類を含有する水溶液に、目的に応じて前述の各種添加剤を適宜選択し、必要量添加した液体組成物を乾燥することにより固体組成物として得ることもできる。その乾燥方法としては、例えば凍結乾燥法や噴霧乾燥法等が挙げられるが、凍結乾燥法を用いることが好ましい。これら固体組成物を用時、水などの溶媒に溶解して使用することができる。
- 15      20

- 本発明に係るグレリン類含有医薬組成物は、哺乳動物（ヒト、サル、イヌ、ラット、マウス等）に対して医薬品として投与することができる。当該医薬組成物の適用可能な疾患またはその効果は、GH欠損または低下が関係するものとして、例えば、小人症、正常人での骨芽細胞および骨再構成の活性化、GH欠乏症成人での筋肉量および筋力の増強、GH欠乏症成人での運動能力の向上、小児の重度
- 25

火傷治癒、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防、重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進、老人性の体重減少、脂肪組織拡大および皮膚萎縮を抑制する効果などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

5        また、GH欠損または低下と直接関係しない疾患または効果としては、例えば当該医薬組成物は拍動量の増加効果があることから、心不全等の心疾患の治療に効果がある。当該医薬組成物の効果はヒトには限らない。すなわち、動物の成長促進、食肉中の脂身の低減等、GH投与と同等以上の効果がある。また、例えば本発明に係る医薬組成物は脳室内投与および静脈内投与によって食欲増進作用があることから、食欲不振や拒食症を治療するための食欲増進剤として用いることもできる。更に、例えば、本発明に係る医薬組成物は胃運動および胃酸分泌を促進する作用があることから、非潰瘍性消化不良、突発性軽症胃アトニー、機能的消化不良および逆流性食道炎等の胃機能性疾患の治療剤として用いることもできる。

15        加えて、例えば本発明に係る医薬組成物は静脈内投与により、骨髓、十二指腸および空腸において細胞増殖促進作用が認められたことから、腸管粘膜保護剤、経静脈栄養時の小腸粘膜障害予防剤及び骨粗鬆症治療剤として用いることができる。また、上記医薬組成物は以下のような疾患の治療または身体状態の改善に効果がある。例えば、高齢者における成長ホルモン放出の刺激処置、糖質コルチコ  
20        イドの異化副作用の予防、オステオポロシスの予防と治療、免疫系の刺激、損傷治癒の促進、骨折修復の促進、成長遅滞の治療、成長遅滞に起因する腎不全もしくは機能不全の治療、成長ホルモン欠損児童を含む生理学的不足状態および慢性疾患に関連した不足状態の治療、肥満および肥満に関連した成長遅滞の治療、プラダー・ヴィリ症候群およびターナー症候群に関連した成長遅滞の治療、火  
25        傷患者の回復の促進および入院の削減、子宮内発育遅滞、骨格形成異常、高コルチコイド症およびクッシング症候群の治療、拍動性成長ホルモン放出の誘導、ストレス患者における成長ホルモンの代用、骨軟骨形成異常、ヌーナン症候群、精

神分裂病、うつ病、アルツハイマー病、遅延損傷治癒および心理社会的剥奪の治療、肺機能不全および呼吸器依存症の治療、大手術後のタンパク質異化反応の減衰、癌やエイズ（A I D S）のような慢性疾患によるタンパク損失および悪液質の減少、膵島細胞症を含む高インスリン血症の治療、排卵誘発のためのアジュバント療法、胸腺の発育を刺激するため、および加齢に伴う胸腺機能の衰退を防ぐため、免疫抑制患者の治療、筋肉強度、運動性の向上、高齢者における皮膚の厚さ、代謝恒常性、腎恒常性の維持、骨芽細胞、骨再造形および軟骨成長の刺激等が挙げられる。

また動物においても以下のような効果が期待される。例えば、動物の成長の速度増加、動物の乳生産もしくは獣毛生産増加、ペット動物における免疫系の刺激、ペット動物における高齢疾患の治療、家畜の成長促進並びにヒツジにおける増毛などが挙げられる。

上述した本発明のグレリン類を含有する医薬品の剤型は、水に溶解した状態であれば、各種経路によって投与することができる。例えば、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、点滴静脈注射などの注射剤として投与することができる。また、経鼻あるいは経肺、さらには経皮あるいは経粘膜、点眼製剤等の形態で非経口的に投与することができる。また液剤あるいはこれをカプセル内に封入したカプセル剤の形態で経口的に投与することもできる。

## 実施例

以下に本発明を、グレリン類の安定性に関する試験例である実施例を説明することにより、さらに詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの例により限定されるものでない。

本実施例において使用する主な略号は、それぞれ以下の意味を有する。また、用いた試験法と機器は、特に記載しない限り以下に記載のものを使用した。

[主な略号]

Dha : デヒドロアラニン (dehydroalanine)

TFA : トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)

HBTU : 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium

Hexafluorophosphate

HOBt : 1-hydroxybezotriazole

5 TIPS : triisopropylsilane

DIPEA : diisopropylethylamine

Fmoc : fluorenylmethoxycarbonyl

Boc : t-butyloxycarbonyl

tBu : t-butyl

10 Trt : trityl

DMAP : 4-dimethylaminopyridine

EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

Pmc : 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl

15 [使用機器]

(A) ペプチド自動合成機

アプライドバイオシステム社製 : 433A合成機

(B) 分析用HPLCシステム

機器 : 島津 LC-10A システム

20 カラム : YMC-Pack PROTEIN-RP (4.6 mmΦ × 150 mm) または YMC-Pack ODS-AM  
(4.6 mmΦ × 250 mm)

カラム温度 : 40℃

溶出液 : 0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を最高 50%まで直  
線的に変化させた。

25 流速 : 1 mL/分

検出 : UV (210 nm)

注入量 : 10~500 μL

## (C) 分取用HPLCシステム

機器：Waters 600 Multisolvent Delivery System

カラム：YMC-Pack ODS-A (20 mmΦ × 250 mm) または YMC-Pack PROTEIN-RP  
(20 mmΦ × 250 mm)

- 5 溶出液：0.1%トリフルオロ酢酸または5%酢酸中、適宜アセトニトリル濃度を直線的に変化させた。

流速：10 mL/分

検出：210 nm および 260 nm

流入量：1~2 mL (2 mL 以上はポンプにより注入)

## 10 (D) 保存庫

ナガノ科学(株)製 恒温恒湿器 LH-30 型 (5℃・40℃)

ナガノ科学(株)製 プレハブ式恒温恒湿室 LH-20 型 (25℃)

## (E) 質量分析機

機器：フィニガン MAT TSQ700

- 15 イオン源：ESI

検出イオンモード：positive

スプレー電圧：4.5kV

キャピラリー温度：250℃

移動相：0.2%酢酸・メタノール混液 (1 : 1)

- 20 流速：0.2 mL/分

スキャン範囲：m/z 300~1500

## (F) アミノ酸配列分析

機器：パーキンエルマー社製 アプライドバイオシステム 477A 型シーケンサー

- 25 (G) アミノ酸組成分析

機器：日立製作所(株)製 L-8500 型アミノ酸分析機計

試料：封管中、0.1%フェノールを含む 6M 塩酸で 110℃、24 時間加水分解し

た。

参考例：ヒトグレリンの合成

ペプチド自動合成機を用いて、Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂（アプライドバイオシ  
5 ステムズジャパン（株）製、472 mg、0.25 mmol）に、ピペリジンによる脱 Fmoc  
と HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸（ただし N 末グリシンのみ Boc-グリシン）導  
入とを繰り返し、Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OtBu)-  
His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(O  
tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Ar  
10 g(Pmc)-HMP 樹脂を構築した。得られた保護ペプチド樹脂（1.7 g）を 1%TFA-5%  
TIPS-塩化メチレン溶液（15 mL）で 30 分間処理した。ペプチド樹脂を濾取し、塩  
化メチレン（30 mL）で数回洗浄した後、1%DIPEA（30 mL）、ついで塩化メチレン  
（30 mL）で洗浄した。得られた脱 Trt ペプチド樹脂を N-メチルピロリドン（10  
mL）に膨潤させ、DMAP（31 mg、0.25 mmol）存在下、オクタン酸（144.2 mg、1.0  
15 mmol）、EDC・HCl（192 mg、1.0 mmol）を加え 16 時間反応させた。樹脂を濾取し、  
N-メチルピロリドン、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖  
がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂を得た。このものに、88% TFA-5%  
Phenol-2% TIPS-5% H<sub>2</sub>O からなる脱保護試薬（15 mL）を加え、室温で 2 時間攪  
拌した。樹脂を濾去し、濾液を濃縮後、残渣にエーテルを加え沈澱物を得た。沈  
20 殿を濾取、乾燥し、粗ペプチド 900 mg を得た。本品 200 mg を水 10 mL に溶かし、  
YMC-Pack ODS-A（20 mmΦ× 250 mm）に添加し、5%酢酸中、アセトニトリル 0%  
から 60%までの 60 分間直線グラジエント（流速：10 mL/min）で溶出させた。目  
的画分を分取後、凍結乾燥し、60 mg の目的物（ヒトグレリン酢酸塩：酢酸含量  
10.9%）を得た。

25 ESI-MS：3371（理論値 3370.9）、  
ロイシン基準アミノ酸組成比：Ser；3.43（4），Glx；5.93（6），Gly；1.01（1），  
Ala；1.00（1），Val；0.98（1），Leu；2（2），Phe；1.00（1），Lys；4.02（4），His；

1.00 (1), Arg; 2.98 (3), Pro; 3.93 (4) (括弧内は理論値)、

アミノ酸配列分析：ヒトグレリンの配列と一致（3位オクタノイルセリンは検出せず）。

ラットグレリンなど他のグレリン類も、同様の製造方法により得ることができる。なお、以下の実施例では参考例で調製したグレリンを使用した。

### 実施例 1：グレリン分解物の構造解析

グレリン類の溶液中での安定性を確保するためには、溶液中での分解反応について把握する必要がある。そこで、グレリン類の一つであるヒトグレリンを用いて、溶液中での主要な分解物の構造解析を行い、その生成機構を推定した。

ヒトグレリン約  $5.0 \mu\text{mol}$  (=17 mg) を Britton-Robinson 緩衝液 (pH 7.0) (0.04 M リン酸・酢酸・ホウ酸水溶液と、0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液を適当な割合で混合して pH を調整した) 34 mL に溶解し、ヒトグレリン濃度約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  (=0.5 mg/mL) の水溶液を調製した。これを褐色ガラスアンプルに分注して熔閉した後、 $40 (\pm 1) ^\circ\text{C}$  で4日間または14日間保存した。保存後の水溶液を HPLC で分析した結果を、第1図 (a) および (b) に示した。

第1図 (a) に示したように、 $40 ^\circ\text{C}$  / 4日間保存後の HPLC チャートには24～28分付近に2つの主要な分解物のピークが認められた（分解物Bおよび分解物C）。これらの2つピークをそれぞれ分取して構造解析を実施した。

#### 分解物 B：

ESI-MS 上、3245 の質量数を示し、この値はヒトグレリンのオクタノイル基が加水分解により脱離したデスアシルヒトグレリン（以下、デスアシル体）の質量に一致した。さらに分解物Bをアミノ酸組成分析およびアミノ酸配列分析により解析したところ、アミノ酸組成比、アミノ酸配列分析ともにデスアシル体の理論値と一致した。このことから、分解物Bは、デスアシル体であることを確認した。

## 分解物 C :

ESI-MS 上、3227 の質量数を示し、この値はヒトグレリンのオクタノイル基が  $\beta$  脱離した [3 位デヒドロアラニン] ヒトグレリン (以下、Dha 体) と一致した。本推定構造を検証するために、分解物 C の水溶液に過剰量のエタントールを加え、0.05 M 水酸化ナトリウム水溶液を適量加えて中性にして得られた反応物を、質量分析、アミノ酸組成分析、アミノ酸配列分析により解析したところ、この反応物は [3 位エチルシステイン] ヒトグレリンであることが示された。すなわち、ESI-MS : 3289 は、Dha 体 (3227) + エタントール (62) に一致し、アミノ酸組成分析、アミノ酸配列分析ともにエチルシステインが検出された。これは、Dha 体の 3 位デヒドロアラニンにエタントールが求核反応して [3 位エチルシステイン] ヒトグレリンが生成したことを示す。以上より、分解物 C は、Dha 体であることが確認された。

以上の結果から、グレリン類の一種であるヒトグレリンを中性水溶液に溶解した際の主要な分解物は、オクタノイル基が加水分解を受けたデスアシル体、および  $\beta$  脱離した Dha 体であることが判明した。

また、14 日保存後のチャートである第 1 図 (b) では、分解物 B および分解物 C の他に、いくつかのピークが認められた (分解物 D および分解物 E など)。これらの生成機構を調べる目的で、デスアシル体 (分解物 B) あるいは Dha 体 (分解物 C) を水溶液中で保存した。

デスアシル体あるいは Dha 体を、前述の Britton-Robinson 緩衝液 (pH 7.0) にそれぞれ溶解し、デスアシル体あるいは Dha 体の濃度が約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.5 \text{ mg/mL}$ ) の水溶液を調製した。これらを褐色ガラスアンプルに分注して熔閉した後、 $40 (\pm 1) ^\circ\text{C}$  で、デスアシル体は 14 日間、Dha 体は 3 日間保存した。保存後の水溶液を HPLC で分析した結果を、第 1 図 (c) および (d) に示した。

第 1 図 (c) に示すように、デスアシル体を  $40 ^\circ\text{C}$  14 日間保存後の HPLC チャートでは、第 1 図 (b) の分解物 D と同じ保持時間 (26 分付近) に 1 つの主要



な分解物のピークが認められた。このピークを分取して質量分析、アミノ酸組成分析、およびアミノ酸配列分析を行ったところ、この分解物はデスアシルヒトグレリン (3-28) であることが示された (ESI-MS : 3101 (理論値 3100.5)、アミノ酸組成分析、アミノ酸配列分析ともにデスアシルヒトグレリン (3-28) と一致)。

また、第1図 (d) に示すように、Dha 体を 40℃ / 3日間保存後の HPLC チャートでは、第1図 (b) の分解物 E と同じ保持時間 (36分付近) に分解物の幅広いピークが認められた。このピークを分取して質量分析、アミノ酸組成分析、およびアミノ酸配列分析を行ったところ、この分解物は (N<sup>α</sup>-CO-C(=CH<sub>2</sub>)-OH) ヒトグレリン (4-28) (以下、Dha 体2次分解物) であると推測された (ESI-MS : 3083 (理論値 3083.5)、アミノ酸組成分析は推定構造と一致、アミノ酸配列分析は1残基目から反応進行せず。) また、第1図 (d) には、30~35分付近に小さい分解物のピークが数個認められたが、第1図 (b) にもこれらのピークが認められおり、ヒトグレリンから Dha 体を介してこれらの分解物が生成すると考えられた。

以上より、ヒトグレリンを中性水溶液に溶解した際の分解は、まず、ヒトグレリンからデスアシル体または Dha 体が生成する。さらに、デスアシル体から断片化が起こり、デスアシルヒトグレリン (3-28) が生成する。また、Dha 体からは断片化によって Dha 体2次分解物や更なる分解物が生成することが判った。

したがって、グレリン類の水溶液中で安定性を確保するためには、グレリン類の特徴的構造である疎水性修飾構造における各種反応が生じないように留意する必要があることが判った。

#### 実施例2：各 pH 値を有する緩衝液中でのグレリンの安定性 (その1)

グレリン類の一種であるヒトグレリンを用いて、溶液の pH が安定性に及ぼす影響について評価した。

ヒトグレリンを以下の水溶液に、ヒトグレリン濃度約 0.15 μmol/mL (=0.5

mg/mL) となるように溶解した。

0.1 M 塩酸水溶液 (pH 1.1)

McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) (0.1 M クエン酸水溶液と 0.2 M リン酸水素二ナトリウム水溶液を適当な割合で混合して pH を調整した)

5

この水溶液を 25 (±2) °C で 8 時間、24 時間、48 時間、72 時間保存した。保存前後の水溶液を HPLC で分析し、総ピーク面積に対するヒトグレリン、デスアシル体、Dha 体のピーク面積比をそれぞれ算出した。保存前後の pH を測定することにより、pH の大きな変動が無いことを確認した。

10      その結果を第 2 表に示した。

第2表

		pH 実測値	総ビーク面積に対するビーク面積比 (%)		
			ヒトケレリン <sup>a)</sup>	デスアシル体 <sup>b)</sup>	Dha体 <sup>b)</sup>
pH 1	保存開始時	1.1	98.89	0.27	0.21
	8時間後	1.2	94.40	4.88	0.15
	24時間後	1.2	86.00	13.31	0.09
	48時間後	1.2	74.62	24.63	0.04
	72時間後	1.2	65.04	34.17	0.00
pH 2	保存開始時	2.0	99.07	0.10	0.20
	8時間後	2.0	98.82	0.34	0.20
	24時間後	2.0	98.24	0.89	0.23
	48時間後	2.0	97.35	1.76	0.24
	72時間後	2.0	96.46	2.59	0.25
pH 3	保存開始時	3.0	99.07	0.10	0.20
	8時間後	3.1	98.98	0.20	0.20
	24時間後	3.1	98.77	0.38	0.23
	48時間後	3.1	98.40	0.67	0.24
	72時間後	3.1	98.03	0.98	0.25
pH 4	保存開始時	4.0	99.07	0.09	0.20
	8時間後	4.0	99.07	0.12	0.20
	24時間後	4.0	98.92	0.21	0.21
	48時間後	4.0	98.69	0.37	0.22
	72時間後	4.0	98.44	0.51	0.23
pH 5	保存開始時	5.0	99.06	0.10	0.21
	8時間後	5.0	99.04	0.14	0.21
	24時間後	5.0	98.91	0.24	0.21
	48時間後	5.0	98.59	0.45	0.23
	72時間後	5.0	98.37	0.61	0.24
pH 6	保存開始時	6.0	99.07	0.10	0.20
	8時間後	6.0	98.87	0.28	0.21
	24時間後	6.0	98.28	0.70	0.26
	48時間後	6.0	97.64	1.33	0.31
	72時間後	6.0	96.92	1.97	0.35
pH 7	保存開始時	7.0	98.97	0.16	0.22
	8時間後	7.0	98.15	0.92	0.25
	24時間後	7.0	96.18	2.70	0.43
	48時間後	7.0	93.44	5.22	0.61
	72時間後	7.0	90.75	7.67	0.79
pH 8	保存開始時	8.0	98.61	0.47	0.24
	8時間後	7.9	94.73	3.92	0.68
	24時間後	7.9	87.32	10.57	1.39
	48時間後	7.9	76.95	19.54	2.39
	72時間後	7.9	68.30	27.26	3.12

注 a) : ヒトグレリンのピークエリア比が 98%未満となった箇所を、下線付きとしてマークした。

注 b) : デスアシル体または Dha 体のピークエリア比が 1%以上となった箇所を、下線付きとしてマークした。

5

第 2 表に示す結果から、pH1.0 および 8.0 の水溶液に溶解した場合、8 時間という短時間でデスアシル体が 3%以上生成することが判明した。また、24 時間後において pH7.0 の水溶液で、48 時間後において pH2.0 および pH6.0 の水溶液でデスアシル体の生成量が 1%を超えており、かつ、ヒトグレリンの割合が 98%を下回っていた。一方、pH3.0~5.0 の水溶液に溶解した場合は、デスアシル体およびデヒドロアラニン体の生成が抑制されていた。

以上より、グレリン類の一種であるヒトグレリンの水溶液においては、デスアシル体、Dha 体の生成を抑制するためには、pH2~7 の範囲の水溶液、特に、pH3~6 の範囲の水溶液にすることが好ましいことが理解される。したがって、疎水性修飾構造が特徴であるグレリン類において、疎水性修飾構造における各種反応を抑制して、水溶液中で安定性を確保するためには、pHを 2~7 の範囲、より好ましくは、pHを 3~6 の範囲に制御することが有効であることが判明する。

### 20 実施例 3 : 各 pH 値を有する緩衝液中でのグレリンの安定性 (その 2)

実施例 2 で使用した緩衝液とは異なる緩衝液を使用して、各種の pH 値を有する水溶液中でのグレリン類の安定性を比較、検討した。

グレリン類の一種であるヒトグレリンを、各 pH の Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.1、3.1、4.0、5.0、6.0、7.0、7.9) (0.04 M リン酸・酢酸・ホウ酸水溶液と 0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液を適当な割合で混合して pH を調整した) に溶解し、ヒトグレリン濃度約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  ( $= 0.5 \text{ mg/mL}$ ) の水溶液を調製した。これらをそれぞれ褐色ガラスアンプルに分注して熔閉した。分解速度定数を算出

するにはある程度分解させる必要があるため、苛酷な保存温度である 40 (±1) °C で保存した。経時的にサンプリングし、HPLC によりヒトグレリン濃度 (残存率) を測定した。また、その際に pH を測定し、pH の顕著な変動が起こっていないことを確認した。ヒトグレリンの経時的残存率の変化から各 pH における分解速度定数を算出し、その結果を第 2 図に示した。また、各 pH の水溶液について、40 °C / 1 日保存後の総ピーク面積に対するデスアシル体および Dha 体のピーク面積比を示したものを第 3 図に示した。

第 2 図に示すとおり、ヒトグレリンを溶解した際に特に安定な pH は 3 ~ 6 であった。これらの pH 3.1、4.0、5.0、6.0 の水溶液については、40 °C / 1 週間保存後において残存率は全て 87% 以上であり、目標値 (85%) を上回った。

また、第 3 図から、デスアシル体の生成は、pH が 3 ~ 6 の範囲で抑制され、Dha 体の生成は、pH 2 ~ 7 の範囲で抑制されていることが判明した。

以上より、Britton-Robinson 緩衝液においても、グレリン類の 1 種であるヒトグレリンから、デスアシル体あるいは Dha 体の生成を抑制するためには、pH 2 ~ 7 の範囲の水溶液、特に pH 3 ~ 6 の範囲の水溶液にすることが好ましいことが判明した。

したがって、疎水性修飾構造が特徴であるグレリン類において、疎水性修飾構造における各種分解反応を抑制して、水溶液中でグレリンの安定性を確保するためには、緩衝液の種類にかかわらず、その水溶液の pH を 2 ~ 7、より好ましくは、pH を 3 ~ 6 の範囲内に制御することが有効であることが確認された。

#### 実施例 4：緩衝液の種類の影響 (その 1)

緩衝液としてクエン酸緩衝液を使用し、グレリン類の安定性を評価した。グレリン類の一種であるヒトグレリンを、各 pH の 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 3.6、4.0、4.5、5.0) に溶解し、ヒトグレリン濃度約 0.15 μmol/mL (=0.5 mg/mL) の水溶液を調製した。これらをそれぞれ褐色ガラスアンプルに分注して熔閉した後、40 (±1) °C で保存した。2 週間後にサンプリングして HPLC 測定を行い、ヒト

グレリン濃度から残存率を算出した。また、その際に pH を測定した。それらの結果を第 3 表に示した。

第 3 表

緩衝液 pH		溶液調製 直後	40℃/2 週間 保存後
3.5	残存率 (%)	100	89
	pH 実測値	3.6	3.5
4.0	残存率 (%)	100	88
	pH 実測値	4.0	4.0
4.5	残存率 (%)	100	86
	pH 実測値	4.5	4.4
5.0	残存率 (%)	100	85
	pH 実測値	5.0	4.9

5

第 3 表に示した結果からも判明するように、クエン酸緩衝液にグレリンを溶解した場合、pH 3.5～5.0 の各水溶液の残存率は 85～89% であり、目標値 (85%) を上回った。また、保存前後において pH の変動は認められなかった。したがって、クエン酸緩衝液中においても、グレリン類は本実施例で検討した pH の範囲、すなわち pH 3.5～5.0 の範囲で安定なものであった。

10

#### 実施例 5：緩衝液の種類の影響（その 2）

緩衝液としてグリシン塩酸緩衝液、または酢酸緩衝液を使用して、グレリン類の安定性を評価した。すなわち、グレリン類の一種であるヒトグレリンを、各 pH の 0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.5、3.1、3.6、4.2、4.6、4.8)、または 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 3.1、3.5、4.0、4.5、5.0) に溶解し、ヒトグレリン濃度が約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.5 \text{ mg/mL}$ ) の水溶液を調製した。これらをそれぞれ褐色ガラスアンプルに分注して熔閉した後、40 ( $\pm 1$ ) °C で保存した。2 週間後に

15

サンプリングし、HPLCにより純度を測定した。また、その際に水溶液のpHを測定し、pHの顕著な変動が起こっていないことを確認した。各緩衝液の各pHにおける保存2週間後のヒトグレリン純度についてまとめた結果を図4に示した。

その結果、グリシン塩酸緩衝液、または酢酸緩衝液にグレリンを溶解した場合  
5 には、本実施例で検討したpHの範囲、すなわちpH2.5から5.0の範囲においては、ヒトグレリンの純度は87~97%であり、目標値(85%)以上であった。

以上の実施例2(McIlvaine緩衝液中での安定性)、実施例3(Britton-Robinson  
緩衝液中での安定性)および実施例4(クエン酸緩衝液中での安定性)ならびに  
10 実施例5(グリシン塩酸緩衝液、および酢酸緩衝液中での安定性)の各結果をあわせて考慮すると、水溶液に溶解したグレリン類を安定化させるにはpHを制御することが重要であり、これは緩衝液の種類によって大きくは影響されないことが判明した。

#### 実施例6：各濃度を有するグレリン水溶液の安定性

15 グレリンを含有する水溶液として、各種濃度でのグレリン類の安定性を評価した。すなわち、グレリン類の一種であるヒトグレリンをpH3.5の0.05Mグリシン塩酸緩衝液に溶解し、各種濃度のヒトグレリン水溶液を調製した。

ヒトグレリン水溶液の濃度は、医薬品として使用される可能性のある範囲である、0.03 nmol/mL (=0.1  $\mu$ g/mL)、0.3 nmol/mL (=1.0  $\mu$ g/mL)、3.0 nmol/mL (=10.0  $\mu$ g/mL)、0.3  $\mu$ mol/mL (=1.0 mg/mL) および3  $\mu$ mol/mL (=10 mg/mL) の5  
20 段階の濃度とした。

25℃(±2℃)で24時間保存した後、HPLCによりヒトグレリン濃度(残存率)を測定した。また、その際にpHを測定し、pHの顕著な変動が起こっていないことを確認した。保存開始前を100としたときの各濃度における保存前後の  
25 残存率、およびpH変化についての結果を第4表に示した。

第4表

グレリン濃度		溶液調製 直後	25℃保存 24 時間後
0.03 nmol/mL	残存率(%)	100	62
	pH	3.4	3.5
0.3 nmol/mL	残存率(%)	100	98
	pH	3.5	3.5
3 nmol/mL	残存率(%)	100	98
	pH	3.5	3.6
0.3 $\mu$ mol/mL	残存率(%)	100	101
	pH	3.4	3.3
3 $\mu$ mol/mL	残存率(%)	100	101
	pH	3.4	3.3

表中に示した結果からも判明するように、25℃/24時間保存後において、グレリン含量の高い4種の水溶液（0.3 nmol/mL、3 nmol/mL、0.3  $\mu$ mol/mL および 3  $\mu$ mol/mL）では、グレリンの残存率の低下やpHの変化は認められず、水溶液は安定なものであった。

一方、グレリン含量が最も低い水溶液（0.03 nmol/mL）では、25℃/24時間保存後の残存率は62%と低いものであったが、pHの変動はなく、チャート上、デスアシル体やDha体など分解物のピークは認めらなかったことから、分解は起こっておらず、この残存率の低下は、容器へのグレリンの吸着による含有量の低下であると判断された。したがって、グレリン含量の最も低い水溶液（0.03 nmol/mL）についても安定であったと判断した。

以上より、pHを制御した緩衝液中において、ヒトグレリンは、約0.03 nmol/mL～約3  $\mu$ mol/mLの濃度範囲で安定であることが判明した。

#### 実施例7：各pH値を有する水溶液中でのグレリン類の安定性（その1）

グレリン類の一種であるヒトグレリンを用いて、溶液のpHが安定性に及ぼす影響について評価した。



ヒトグレリンを精製水に、ヒトグレリン濃度約  $0.03 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.1 \text{ mg/mL}$ ) となるように溶解した。この水溶液の pH は 4.7 であった。この水溶液を 4 等分し、1 つはそのままとし、残りの 3 つの水溶液に、塩酸あるいは水酸化ナトリウムの水溶液を加えて、それぞれ pH 1.8 (塩酸濃度 17 mM)、pH 3.9 (塩酸濃度 0.20 mM)、pH 7.8 (水酸化ナトリウム濃度 0.24 mM) の水溶液を調製した。

これらの水溶液を  $25 (\pm 2) ^\circ\text{C}$  で 1 日間、3 日間保存した。保存前後の水溶液を HPLC で分析し、総ピーク面積に対するヒトグレリン、デスアシル体、Dha 体のピーク面積比をそれぞれ算出した。

その結果を第 5 表に示した。

10

第 5 表

		総ピーク面積に対するピーク面積比 (%)		
		ヒトグレリン <sup>a)</sup>	デスアシル体 <sup>b)</sup>	Dha 体 <sup>b)</sup>
pH 1.8	保存開始時	99.16	0.12	0.20
	1日後	<u>97.68</u>	<u>1.46</u>	0.31
	3日後	<u>95.01</u>	<u>4.08</u>	0.34
pH 3.9	保存開始時	99.21	0.07	0.20
	1日後	99.19	0.09	0.20
	3日後	99.14	0.14	0.19
pH 4.7	保存開始時	99.20	0.06	0.20
	1日後	99.12	0.15	0.21
	3日後	98.94	0.28	0.21
pH 7.8	保存開始時	98.85	0.33	0.24
	1日後	<u>94.78</u>	<u>3.65</u>	0.86
	3日後	<u>87.84</u>	<u>9.84</u>	<u>1.65</u>

注 a) : ヒトグレリンのピークエリア比が 98 % 未満となった箇所を、下線付きとしてマークした。

注 b) : デスアシル体または Dha 体のピークエリア比が 1 % 以上となった箇所を、下線付きとしてマークした。

15

第 5 表に示す結果から、pH 1.8 および 7.8 の水溶液に溶解した場合、保存開始から 1 日後で、デスアシル体が 1 % 以上生成し、かつ、ヒトグレリンの割合が

98%を下回っていた。また、3日後においてpH 7.8の水溶液でデヒドロアラニン体の生成量が1%を超えた。一方、pH 3.9および4.7の水溶液に溶解した場合は、デスアシル体およびデヒドロアラニン体の生成が抑制されていた。

以上より、グレリン類の一種であるヒトグレリンの水溶液においては、デスアシル体、Dha体の生成を抑制するためには、pHを2～7の範囲に調節することが好ましいことが理解される。したがって、疎水性修飾構造が特徴であるグレリン類において、疎水性修飾構造における各種反応を抑制して、水溶液中で安定性を確保するためには、pHを2～7の範囲に制御することが有効であることが判明する。

10

#### 実施例8：各pH値を有する水溶液中でのグレリン類の安定性（その2）

グレリン類の一種であるヒトグレリン（1-7）アミドを用いて、溶液のpHが安定性に及ぼす影響について評価した。ヒトグレリン（1-7）アミドはほとんどの哺乳類、鳥類、魚類などに共通のアミノ酸配列であり（第1表参照）、またこの化合物自体がヒトグレリンと同等の活性を有することが知られている（国際公開WO 01/07475号公報）。

15

ヒトグレリン（1-7）アミドを、濃度が約  $0.12 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.1 \text{ mg/mL}$ ) となるように精製水に溶解した。この水溶液のpHは5.0であった。この水溶液を4等分し、1つはそのままとし、残りの3つの水溶液に、塩酸あるいは水酸化ナトリウムを加えて、それぞれpH1.8（塩酸濃度17 mM）、pH4.1（塩酸濃度0.05 mM）、pH7.9（水酸化ナトリウム濃度0.20 mM）の水溶液を調製した。

20

これらの水溶液を25（±2）℃で1日間、3日間保存した。保存前後の水溶液をHPLCで分析し、総ピーク面積に対するヒトグレリン（1-7）アミド、デスアシルヒトグレリン（1-7）アミド、[3位デヒドロアラニン]ヒトグレリン（1-7）アミドのピーク面積比をそれぞれ算出した。

25

その結果を第6表に示した。

第6表

		総ピーク面積に対するピーク面積比 (%)		
		ヒトグレリン(1-7) <sup>a)</sup>	デスアシルヒトグレリン (1-7)アミド <sup>b)</sup>	[3位デヒドロアラニン]ヒト グレリン(1-7)アミド <sup>b)</sup>
pH 1.8	保存開始時	98.39	0.98	0.02
	1日後	<u>95.40</u>	<u>3.75</u>	0.07
	3日後	<u>90.11</u>	<u>8.89</u>	0.10
pH 4.1	保存開始時	98.76	0.72	0.00
	1日後	98.68	0.73	0.03
	3日後	98.60	0.77	0.01
pH 5.0	保存開始時	98.69	0.70	0.00
	1日後	98.57	0.73	0.02
	3日後	98.51	0.79	0.06
pH 7.9	保存開始時	98.22	<u>1.12</u>	0.03
	1日後	<u>95.89</u>	<u>3.21</u>	0.23
	3日後	<u>92.54</u>	<u>6.21</u>	0.54

注 a) : ヒトグレリン (1-7) アミドのピークエリア比が 98 % 未満となった箇所、下線付きとしてマークした。

注 b) : デスアシルヒトグレリン (1-7) アミドまたは [3 位デヒドロアラニン]

5 ヒトグレリン (1-7) アミドのピークエリア比が 1 % 以上となった箇所を、下線付きとしてマークした。

第6表に示す結果から、pH 1.8 および 7.9 の水溶液に溶解した場合、保存開始から 1 日後で、ヒトグレリン (1-7) アミドの割合が 98% を下回っていた。

10 一方、pH 4.1 および 5.0 の水溶液に溶解した場合は、分解が抑制されていた。以上より、グレリン類の一種であるヒトグレリン (1-7) アミドの水溶液においては、pH を 2 ~ 7 の範囲に調節することが好ましいことが理解される。したがって、疎水性修飾構造が特徴であるグレリン類において、疎水性修飾構造における各種反応を抑制して、水溶液中で安定性を確保するためには、pH を 2 ~ 7

15 の範囲に制御することが有効であることが判明した。

### 実施例 9 : ヒトグレリン低濃度水溶液に吸着抑制剤を添加したときのグレリンの 吸着抑制に及ぼす影響

実施例 6 において、医薬品として使用される濃度の範囲で、グレリン類が容器等へ吸着する性質があることが示された。そこで、吸着抑制剤の効果について調べた。

吸着抑制剤として、界面活性剤であるポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（以下、Tween80）および塩化ベンザルコニウムについて検討した。ヒトグレリン濃度を医薬品として使用されるグレリン類の濃度範囲内である、約 0.3 nmol/mL (=1.0  $\mu$ g/mL) となるように、5%マンニトール、0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解した。

なお、コントロールとして吸着抑制剤を含まない水溶液を用いた。吸着抑制剤の濃度は、0.01%および0.1%の2段階とした。

これら 5 種の試験水溶液のそれぞれについて、調整直後のヒトグレリンの濃度を HPLC により測定した後、各試験溶液をそれぞれ、ガラス製の試験管に移し替えた。その後、ガラス製の試験管に移し替える操作を繰り返し、5 回および 10 回操作後のグレリンの残存率を、HPLC で測定した。同じ実験をポリプロピレン製の試験管についても実施した。それらの結果を第 7 表にまとめて示した。

第 7 表

吸着抑制剤		溶液調製直後	ガラス <sup>a)</sup>		ポリプロピレン <sup>b)</sup>	
種類	濃度		5 回移し 替え後	10 回移し 替え後	5 回移し 替え後	10 回移し 替え後
なし	-	100	0	0	51	19
Tween 80	0.01%	100	17	0	90	90
	0.1%	100	20	5	93	91
塩化ベンザ ルコニウム	0.01%	100	81	64	97	96
	0.1%	100	99	99	99	101

注 a) : 旭テクノグラス社製 (10 mL)

注 b) : CORNING 社製 (15 mL)

第7表に示した結果からも判明するように、吸着抑制剤を添加しない場合は、ガラス製試験管、ポリプロピレン製試験管のいずれに対しても、移し替え操作によりグレリンの濃度が大きく低下した。特に、ガラス製試験管ではヒトグレリン濃度が HPLC 分析で検出されないレベルまで低下した。一方、吸着抑制剤として Tween80 を添加した場合は、いずれの濃度でもポリプロピレン製試験管に対しては高い吸着抑制効果が示された。また、吸着抑制剤として塩化ベンザルコニウムを添加した場合は、いずれの濃度でもガラス製試験管およびポリプロピレン製試験管ともに、高い吸着抑制効果が示された。

以上より、医薬品として使用される濃度の範囲のグレリン類を含有する水溶液においては、Tween80 および塩化ベンザルコニウムは、グレリン類の容器等への吸着を抑制するのに有効であることが判った。したがって、本発明の医薬組成物の製造時、長期保存時および投与時において、これら吸着抑制剤が有用であることが理解される。

#### 実施例 10：ヒトグレリン低濃度水溶液に糖類を添加したときのグレリンの吸着抑制に及ぼす影響

実施例 9 において、吸着抑制剤の添加により、グレリン類が容器等へ吸着する性質が抑えられることが示された。ここでは、糖類の吸着抑制効果について調べた。糖類の水溶液として 5% マンニトール水溶液を用い、これにヒトグレリンを溶解した際の容器等への吸着を評価した。

なお、コントロールとして生理食塩水を用いた。ヒトグレリン濃度は、医薬品として使用されるグレリン類の濃度範囲内である、約 3 nmol/mL (=10  $\mu$ g/mL) および約 30 nmol/mL (=100  $\mu$ g/mL) の 2 段階について調べた。

これら 4 種の試験水溶液のそれぞれについて、調整直後のヒトグレリンの濃度を HPLC により測定した後、各試験溶液をそれぞれ、ポリプロピレン製の試験管に移し替えた。その後、ポリプロピレン製の試験管に移し替える操作を繰り返し、5 回操作後のグレリンの残存率を、HPLC で測定した。それらの結果を第 8 表にま

とめて示した。

第8表

溶解液		溶液調製直後	ポリプロピレン <sup>a)</sup>
種類	ヒトグレリン濃度		5回移し替え後
生理食塩水	10 $\mu\text{g/mL}$	100	32
	100 $\mu\text{g/mL}$	100	89
5%マンニトール水溶液	10 $\mu\text{g/mL}$	100	98
	100 $\mu\text{g/mL}$	100	99

注 a) : CORNING 社製 (15 mL)

5

第8表に示した結果からも判明するように、生理食塩水に溶解した場合は、ポリプロピレン製試験管に対して、移し替え操作によりグレリンの濃度が大きく低下した。特に、10  $\mu\text{g/mL}$  とした場合ではヒトグレリン濃度が元の 32% にまで低下した。一方、5%マンニトール水溶液に溶解した場合は、いずれのヒトグレリン濃度の場合でもポリプロピレン製試験管に対して高い吸着抑制効果が示された。

10

以上より、医薬品として使用される濃度の範囲のグレリン類を含有する水溶液においては、糖類はグレリン類の容器等への吸着を抑制するのに有効であることが判った。したがって、本発明の医薬組成物の製造時、長期保存時および投与時において、糖類が有用であることが理解される。

15

#### 実施例 11 : 用時溶解型製剤の製造およびその安定性の評価

本発明が提供する医薬組成物のひとつの形態として、用時溶解型の製剤を凍結乾燥法により製造し、その溶解性等を評価した。

0.1%塩化ベンザルコニウム、5%マンニトール、0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) にヒトグレリンを溶解して、ヒトグレリン濃度が約 0.3 nmol/mL (=1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) となる水溶液を調製した。この水溶液の調整直後のヒトグレリン濃度を

20

HPLCにより測定し、またpHを測定した。その結果、ヒトグレリン濃度は $1.0\mu\text{g/mL}$ 、pHは3.5であった。次いで、この水溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥の条件は、 $-25^{\circ}\text{C}$ で24時間減圧乾燥した後、さらに $20^{\circ}\text{C}$ で24時間減圧乾燥した。得られた凍結乾燥品は、良好な形状の白色固形物であった。

- 5 得られた凍結乾燥品について、凍結乾燥の操作開始前からの質量減少分に相当する精製水を加えて、溶解性、ヒトグレリン濃度およびそのpHを評価した。その結果、溶解性は速やかであり、また沈殿等の不溶物は認められなかった。したがって、用時溶解型の製剤として、好ましい溶解性を有することがわかった。また、この水溶液のヒトグレリン濃度の測定結果は $1.0\mu\text{g/mL}$ となり、これは凍結乾燥前、調製直後の水溶液のヒトグレリン濃度と等しく、凍結乾燥による含量の低下がないことが示された。また、pH測定結果は、pH3.5となり、これは凍結乾燥前、調製直後の水溶液のpHと等しかったことから、本発明の凍結乾燥品は水に溶解後、ヒトグレリンの安定性が確保されうる水溶液であることが判明した。
- 10
- 15 以上より、本発明のグレリンを含有する凍結乾燥品は、グレリン含有するpHを調節した緩衝液を凍結乾燥することにより得られること、および当該凍結乾燥品は、用時溶解製剤として有用であることが示された。

#### 製造例1：pHを調節したヒトグレリン含有の医薬組成物の調製

- 20 グレリン類の一つである、ヒトグレリンを精製水に溶解してヒトグレリンの濃度が約 $0.15\mu\text{mol/mL}$  ( $=0.5\text{ mg/mL}$ ) となる水溶液を調製した。この水溶液のpHを測定しながら0.1 M塩酸水溶液を少量加え、最終pHを4.0に調節し、ヒトグレリンを含有する水溶液として、医薬組成物を得た。

#### 製造例2：ラットグレリンをグリシン塩酸緩衝液に溶解した医薬組成物の調製

- 25 グレリン類の一つである、ラットグレリンを0.05 Mグリシン塩酸緩衝液 (pH3.5) に溶解して、ラットグレリンの濃度が約 $0.15\mu\text{mol/mL}$  ( $=0.5\text{ mg/mL}$ ) とな

る水溶液としての医薬組成物を調製した。この水溶液のpHを測定したところ、pH 3.5であった。

5 製造例 3 : [3 位セリン (アセチル)] ヒトグレリンをグリシン塩酸緩衝液に溶解した医薬組成物の調製

グレリン類の一つである、[3 位セリン (アセチル)] ヒトグレリンを 0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解して、[3 位セリン (アセチル)] ヒトグレリンの濃度が約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.5 \text{ mg/mL}$ ) となる水溶液としての医薬組成物を調製した。この水溶液のpHを測定したところ、pH 3.5であった。

10 製造例 4 : [3 位セリン (フェニルプロピオニル)] ヒトグレリンをグリシン塩酸緩衝液に溶解した医薬組成物の調製

グレリン類のひとつである、[3 位セリン (フェニルプロピオニル)] ヒトグレリンを 0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解して、[3 位セリン (フェニルプロピオニル)] ヒトグレリンの濃度が約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.5 \text{ mg/mL}$ ) となる水溶液としての医薬組成物を調製した。この水溶液のpHを測定したところ、pH 3.5であった。

20 製造例 5 : ヒトグレリン (1-5) アミドをグリシン塩酸緩衝液に溶解した医薬組成物の調製

グレリン類のひとつである、ヒトグレリン (1-5) アミドを 0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解して、ヒトグレリン (1-5) アミドの濃度が約  $0.15 \mu\text{mol/mL}$  ( $=0.1 \text{ mg/mL}$ ) となる水溶液としての医薬組成物を調製した。この水溶液のpHを測定したところ、pH 3.5であった。

25 産業上の利用可能性

以上記載のように、本発明により、グレリン類を含有するとともに化学的な安



定性を確保した医薬組成物を提供することができる。また、含有されるグレリン類の容器等への吸着を抑制し、製造時、長期保存時および投与時において、含有量の低下が認められない医薬組成物を提供することができ、その医療上の価値は多大なものである。

## 請求の範囲

1. グレリン類を溶解した水溶液のpHが2～7の範囲にあることを特徴とする水溶液からなる、グレリン類を含有する医薬組成物。
- 5 2. pHが3～6である請求の範囲第1項に記載の医薬組成物。
3. pH調節剤または緩衝剤を添加した請求の範囲第1項または第2項に記載の医薬組成物。
4. 塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、炭酸、重炭酸、グルコン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クエン酸、モノエタノールアミン、乳酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、メタンスルホン酸、リンゴ酸、10 プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、またはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上をpH調節剤として含む請求の範囲第3項に記載の医薬組成物。
5. グリシン、酢酸、クエン酸、ホウ酸、フタル酸、リン酸、コハク酸、乳酸、酒石酸、炭酸、塩酸、水酸化ナトリウムまたはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上を緩衝剤として含む請求の範囲第3項に記載の医薬組成物。15
6. 水溶液中のpH調節剤または緩衝剤の濃度が0.01～1000mMである請求の範囲第3項ないし第5項の何れか一項に記載の医薬組成物。
7. 水溶液が緩衝液である請求の範囲第1項ないし第6項の何れか一項に記載の医薬組成物。
- 20 8. 緩衝液が、グリシン塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸－リン酸緩衝液、リン酸－酢酸－ホウ酸緩衝液またはフタル酸緩衝液である請求の範囲第7項に記載の医薬組成物。
9. 水溶液中のグレリン類の濃度が、0.03nmol/mL～6μmol/mLである請求の範囲第1項ないし第8項の何れか一項に記載の医薬組成物。
- 25 10. グレリン類が酢酸塩である請求の範囲第1項ないし第9項の何れか一項に記載の医薬組成物。
11. グレリン類がヒトグレリンである請求の範囲第1項ないし第10項の何れ

か一項に記載の医薬組成物。

1 2. 吸着抑制剤を含有する請求の範囲第 1 項ないし第 1 1 項の何れか一項に記載の医薬組成物。

5 1 3. 吸着抑制剤の濃度が 0. 0 0 1 ~ 5 % である請求の範囲第 1 2 項に記載の医薬組成物。

1 4. 吸着抑制剤が界面活性剤である請求の範囲第 1 2 項または第 1 3 項に記載の医薬組成物。

1 5. 請求の範囲第 1 項ないし第 1 4 項に記載の水溶液を乾燥して得られる粉末を含有することを特徴とするグレリン類を含有する医薬組成物。

10 1 6. 乾燥して得られる粉末が、凍結乾燥して得られる粉末である請求の範囲第 1 5 項に記載の医薬組成物。

1 7. グレリン類を溶解した水溶液において、水溶液の pH を 2 ~ 7 の範囲にすることを特徴とする、グレリン類の疎水性修飾構造の分解を抑制する方法。

1 8. pH が 3 ~ 6 である請求の範囲第 1 7 項に記載の方法。

15 1 9. pH 調節剤または緩衝剤を添加することからなる請求の範囲第 1 7 項または第 1 8 項に記載の方法。

2 0. 塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、炭酸、重炭酸、グルコン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クエン酸、モノエタノールアミン、乳酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、メタンスルホン酸、リンゴ酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、またはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上を pH 調節剤として添加することからなる請求の範囲第 1 9 項に記載の方法。

20 2 1. グリシン、酢酸、クエン酸、ホウ酸、フタル酸、リン酸、コハク酸、乳酸、酒石酸、炭酸、塩酸、水酸化ナトリウムまたはこれらの塩からなる群の一つまたはそれ以上を緩衝剤として添加することからなる請求の範囲第 1 9 項に記載の方法。

25 2 2. 水溶液中の pH 調節剤または緩衝剤の濃度が 0. 0 1 ~ 1 0 0 0 mM であ

る請求の範囲第 19 項ないし第 21 項の何れか一項に記載の方法。

23. 水溶液が緩衝液である請求の範囲第 17 項ないし第 22 項の何れか一項に記載の方法。

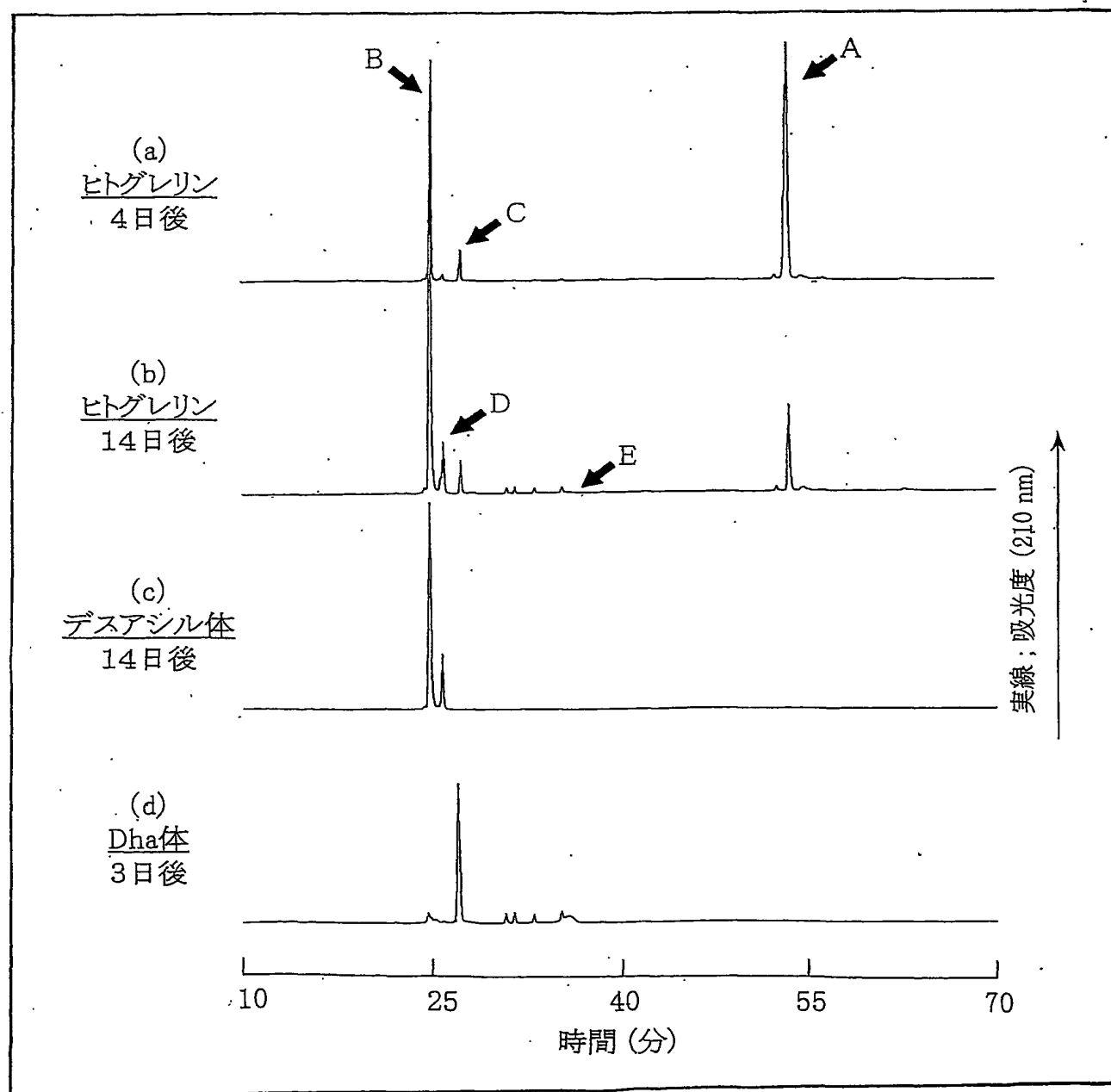
5 24. 緩衝液が、グリシン塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸－リン酸緩衝液、リン酸－酢酸－ホウ酸緩衝液またはフタル酸緩衝液である請求の範囲第 23 項に記載の方法。

25. 水溶液中のグレリン類の濃度が、 $0.03 \text{ nmol/mL} \sim 6 \text{ } \mu\text{mol/mL}$  である請求の範囲第 17 項ないし第 24 項の何れか一項に記載の方法。

10 26. グレリン類が酢酸塩である請求の範囲第 17 項ないし第 25 項の何れか一項に記載の方法。

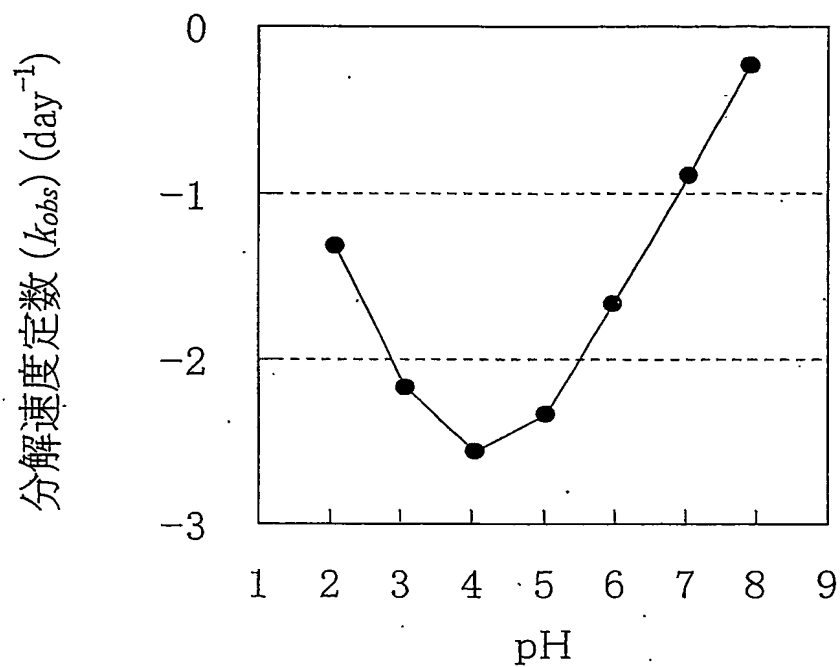
27. グレリン類がヒトグレリンである請求の範囲第 17 項ないし第 26 項の何れか一項に記載の方法。

第1図

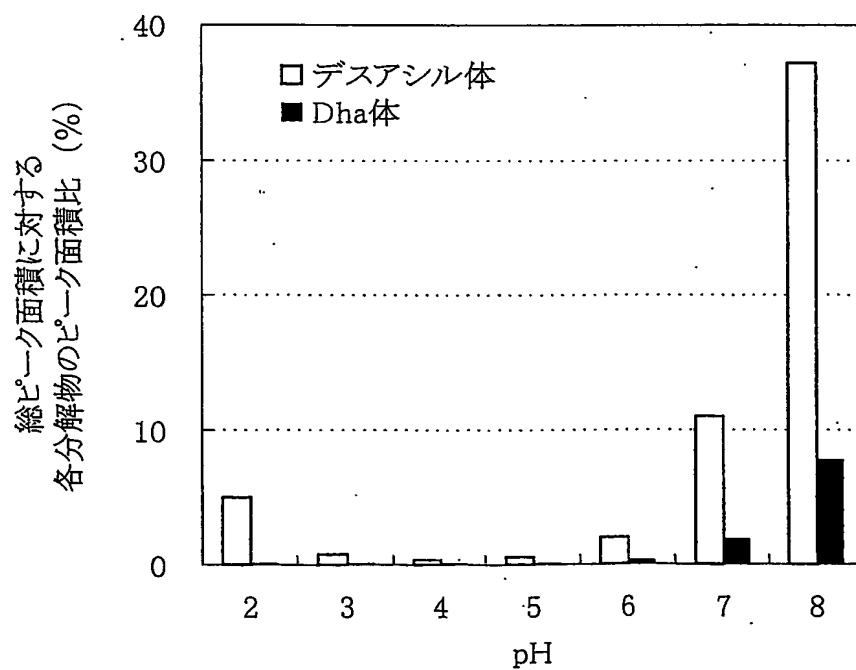


2 / 3

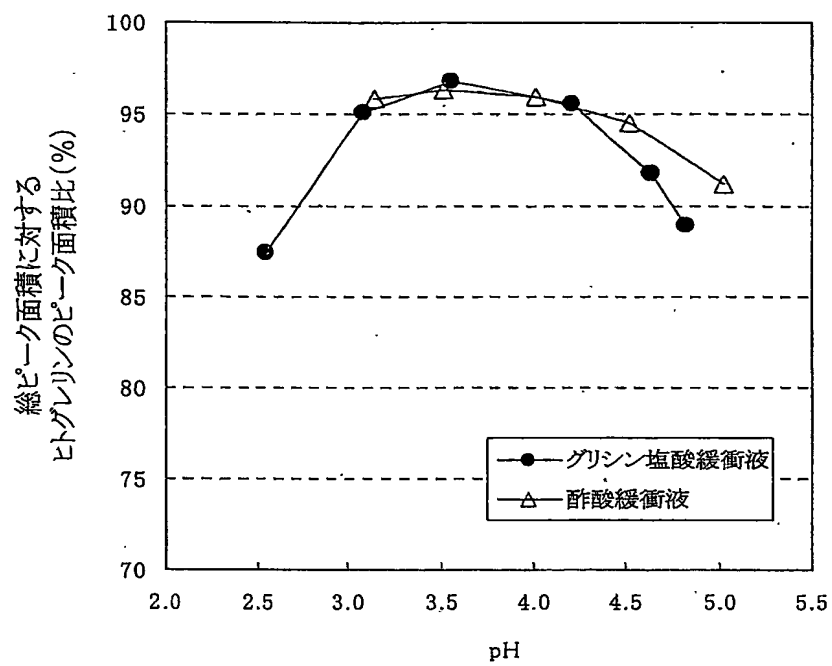
第2図



第3図



第4図



## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI SUNTORY PHARMA CO., LTD.  
<120> Pharmaceutical Composition Containing Ghrelin As Active Ingredient  
<130> DSP-78  
<150> JP 2002-146155  
<151> 2002-05-21  
<160> 21  
<170> PatentIn version 3.1  
<210> 1  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue.

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

<210> 2  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(27)  
<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides (27 amino acids)  
of growth hormone secretagogue

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu  
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

<210> 3  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15



2/7

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

<210> 4  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus  
  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(27)  
<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 4

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu  
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

<210> 5  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for mouse endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 5

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

<210> 6  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Sus scrofa  
  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 6

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg  
20 25

<210> 7  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

3/7

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(27)  
<223> Amino acid sequence for bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 7

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg  
20 25

<210> 8  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Ovis aries

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(27)  
<223> Amino acid sequence for ovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 8

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu  
1 5 10 15

Pro Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg  
20 25

<210> 9  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Canis familiaris

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for dog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
20 25

<210> 10  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Anguilla japonica

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(21)  
<223> Amino acid sequence for eel endogenous peptides of growth hormone secretagogue. This peptide is amidated at C-terminus.

&lt;400&gt; 10

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys

1 5 10 4/7  
15

Lys Pro Pro Arg Val  
20

<210> 11  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Oncorhynchus mykiss

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(23)  
<223> Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue. This peptide is amidated at C-terminus.

<400> 11

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln Gly  
1 5 10 15

Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val  
20

<210> 12  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Oncorhynchus mykiss

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(20)  
<223> Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue. This peptide is amidated at C-terminus.

<400> 12

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys  
1 5 10 15

Pro Pro Arg Val  
20

<210> 13  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Gallus domesticus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(24)  
<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 13

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys  
1 5 10 15

Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg  
20

<210> 14

5/7

<211> 24  
<212> PRT  
<213> Gallus domesticus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(24)  
<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 14

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys  
1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg  
20

<210> 15  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Gallus domesticus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(26)  
<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 15

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys  
1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg Leu His  
20 25

<210> 16  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Rana catesbeiana

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(27)  
<223> Amino acid sequence for frog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 16

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg  
1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met  
20 25

<210> 17  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Rana catesbeiana

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for frog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

6/7

&lt;400&gt; 17

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg  
1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Asn  
20 25

<210> 18  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Tilapia nilotica

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(20)  
<223> Amino acid sequence for tilapia endogenous peptides of growth hormone secretagogue. Amidation

&lt;400&gt; 18

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Asn Lys Val Lys  
1 5 10 15

Ser Ser Arg Ile  
20

<210> 19  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Silurus asotus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(22)  
<223> Amino acid sequence for catfish endogenous peptides of growth hormone secretagogue. This peptide is amidated at C-terminus.

&lt;400&gt; 19

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Gln Lys Pro Gln Asn Arg Gly Asp  
1 5 10 15

Arg Lys Pro Pro Arg Val  
20

<210> 20  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Silurus asotus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(23)  
<223> Amino acid sequence for catfish endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 20

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Gln Lys Pro Gln Asn Arg Gly Asp  
1 5 10 15

Arg Lys Pro Pro Arg Val Gly  
20

<210> 21  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Equus caballus

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(28)  
<223> Amino acid sequence for equine endogenous peptides of growth hormone secretagogue.

<400> 21

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His His Lys Val Gln His Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Lys Pro Arg  
20 25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP03/06349

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K38/25, 9/08, 47/02, 47/04, 47/12, 47/18, A61P5/10, 43/00  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K38/25, 9/08, 47/02, 47/04, 47/12, 47/18, A61P5/10, 43/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	US 5503827 A (Heinrich Woog et al.), 02 April, 1996 (02.04.96), Full text & WO 93/03744 A1 & JP 06-510031 A	1-27												
Y	WO 95/01185 A1 (FERRING AB), 12 January, 1995 (12.01.95), Claims 1, 5, 7 & JP 09-502424 A	1-27												
Y	Seoane L.M. et al., 'Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats.', EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 2000 November, Vol.143(5), R7-9, ISSN:0804-4643	1-27												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td><td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>"&amp;" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 09 July, 2003 (09.07.03)		Date of mailing of the international search report 22 July, 2003 (22.07.03)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer												
Facsimile No.		Telephone No.												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP03/06349

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Peino R. et al., 'Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans.', EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 2000 November, Vol.143(5), R11-14, ISSN:0804-4643	1-27
Y	Arvat E. et al., 'Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue(GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnaturalpeptidyl GHS, and GH-releasing hormone.', JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, 2001 March, Vol.86(3), p1169-74, ISSN:0021-972X	1-27
Y	EP 199992 A1 (EISAI CO., LTD.), 05 November, 1986 (05.11.86), Full text & JP 61-221125 A	12-14
Y	JP 02-096533 A (Toyo Jozo Co., Ltd.), 09 April, 1990 (09.04.90), Full text (Family: none)	12-14
P,X	ISHIMARU, Masanori et al., 'Stability of the octanoyl group essential for expressing the biological activities of rat ghrelin', Peptide Science 2002, 2003 March, 157-160, ISSN:1344-7661	1-27



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/25, 9/08, 47/02, 47/04, 47/12, 47/18,  
A61P5/10, 43/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/25, 9/08, 47/02, 47/04, 47/12, 47/18,  
A61P5/10, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN) MEDLINE(STN) EMBASE(STN) BIOSIS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 5503827 A (Heinrich Woog et al.) 1996. 04. 02., 全文 & WO 93/03744 A1 & JP 06-510031 A	1-27
Y	WO 95/01185 A1 (FERRING AB) 1995. 01. 12., Claims 1,5,7 & JP 09-502424 A	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 07. 03

国際調査報告の発送日

22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Seoane L.M. et al., 'Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats.' EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 2000 Nov, Vol.143(5), R7-9, ISSN:0804-4643	1-27
Y	Peino R. et al., 'Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans.' EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 2000 Nov, Vol.143(5), R11-14, ISSN:0804-4643	1-27
Y	Arvat E. et al., 'Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone.' JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, 2001 Mar, Vol.86(3), p1169-74, ISSN: 0021-972X	1-27
Y	EP 199992 A1 (EISAI CO LTD) 1986.11.05., 全文, & JP 61-221125 A	12-14
Y	JP 02-096533 A (東洋醸造株式会社) 1990.04.09., 全文 (ファミリーなし)	12-14
P, X	Ishimaru, Masanori et al., 'Stability of the octanoyl group essential for expressing the biological activities of rat ghrelin.' Peptide Science 2002, 2003 Mar, 157-160, ISSN:1344-7661	1-27